

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 樹枝狀高分子與 PLGA 共聚物微胞的製備與其包覆藥物 *
* 名稱 : 效率之研究 *
* ***** *

執行計畫學生：張淑楣

學生計畫編號：MOST 103-2815-C-041-011-E

研究期間：103年07月01日至104年02月28日止，計8個月

指導教授：蕭明達

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學生物科技系
(含碩士班)

中華民國

104年03月31日

目錄

第一章	緒論.....	1
1-1	前言	1
1-2	研究動機與目的	1
第二章	文獻探討.....	2
第三章	實驗材料與方法.....	4
3-1	實驗材料	4
3-2	實驗器材	4
3-3	實驗流程	5
3-4	兩性共聚物合成	6
3-4-1	製備樹枝狀聚胺基甲酸酯 (PUAD) 高分子.....	6
3-4-2	製備 PUAD-PLGA	13
3-4-3	微胞的製備溶劑蒸發法	14
3-4-4	FT-IR 結構分析	15
3-4-5	核磁共振光譜儀 ($^1\text{H-NMR}$) 分析.....	15
3-4-6	粒徑分析	16
3-5	細胞試驗	16
3-5-1	細胞種類	16
3-5-2	培養基配置	17
3-5-3	細胞培養與繼代	17
3-6	MTT 分析細胞毒性測試.....	17
3-6-1	原理	17
3-6-2	實驗方法	18
第四章	結果與討論.....	19
4-1	兩性共聚物結構鑑定分析	19
4-1-2	G0.5 PUAD、G1.5 PUAD、G2.5 PUAD FT-IR 光譜鑑定.....	19
4-1-3	G1.0 PUAD、G2.0 PUAD、G3.0 PUAD FT-IR 光譜鑑定.....	19
4-1-4	G3.0 PUAD-EA FT-IR 光譜鑑定.....	20
4-1-5	G 3.0 PUAD-NH ₂ FT-IR 光譜鑑定	21
4-1-6	G3.0 PUAD-PLGA FT-IR 光譜鑑定	21
4-1-7	G3.0 PUAD-PLGA $^1\text{H-NMR}$ 光譜鑑定.....	22
4-2	藥物包覆效率	25
4-3	細胞毒性分析測試結果	26
第五章	結論.....	28
第六章	參考文獻.....	29

第一章 緒論

1-1 前言

過去以高劑量抗癌藥物來治療癌症，但是這種方法常造成患者產生嚴重的副作用，當前可使用的抗癌藥物最嚴重的問題不外乎對細胞的毒性和藥物的副作用，其他限制包括藥物容易分布於全身和藥物也容易在體內被代謝掉而產生極大的不舒服，因此有學者提出以奈米微粒作為藥物輸送系統。近幾年奈米微粒作為藥物的輸送系統越來越受到重視，因為它可以減少藥物降解及損失、降低對人體的副作用、提高藥物的療效、提高疏水性藥物的溶解、維持較長的療效。

本研究將計畫擬生物可分解材料之新樹枝狀聚胺基甲酸酯（PUAD）與聚乳酸甘醇酸（PLGA）以脫水合成方式，形成兩性共聚物，成具有包覆疏水性抗癌藥物之載體，並探討在生物體內其材料包覆藥物之釋放能力，利用傅立葉紅外線光譜（FT-IR）與核磁共振光譜儀（NMR）確定其化學結構。並進行以下物化及生化性質研究，如粒徑大小分析、細胞毒性、緩衝能力、藥物包覆效率及釋放動力

1-2 研究動機與目的

傳統藥劑給藥大多以口服及注射的方式，將藥物送往患部，但這種給藥方式往往會經由體內的血液循環後，易被肝臟代謝或腎臟給排泄掉，卻只有部分藥物達到目的地，導致其療效降低。為了使患部獲得更高的療效，在 1984 年更發展出微胞（Micelles）當做為藥物載體，而在近年微胞已有許多研究指出，能做為難溶解性藥物的載體，將藥物包覆其核心，使藥物安全地躲過一些吞噬細胞系統的攻擊。因此，想藉此特性合成具可將藥物包覆並安全送往患部的材料。

其中樹枝狀高分子的載藥能力，是目前藥物釋放系統中最受重視的，為最具潛力的藥物載體輸送系統，外圍的官能基與空腔部位可以提高藥物進入生物體內釋放藥性，又可依照不同代數的製備以控制大小與構型，使其具備更高的載藥量

及穩定性，並在患部持續性的緩慢釋放，增加生物的可利用性，可避免高濃度藥物所產生的副作用等。

目前已有在本實驗室研究出 PUAD 在其外圍接上 PLGA，合成出兩性共聚物，以 PUAD 為親水端、PLGA 為疏水端，可以有效作為包覆疏水性藥物的材料(如抗癌藥物薑黃素等)，成為生物可分解型高分子，進而提升高分子材料的使用廣度。

第二章 文獻探討

高分子微胞^[1]依其組成與結構可分為許多類型，其中混合型微胞(mixed micelle)是將兩種以上的團聯共聚物混合形成微胞系統，藉以彌補單一微胞功能性的不足，或同時具有兩種團聯共聚物的優點，而一般常見通常由兩性團聯共聚物 (amphiphilic copolymer) 構成。在水相環境下，嵌段或接枝聚合物 (amphiphilic block or graft copolymers)，嵌段共聚物具有親水性和疏水性區域可以自組裝形成核-殼 (core-shell) 奈米微胞，疏水端會彼此聚集而在微胞中形成核心部分，所形成的核心部份提供了疏水性藥物絕佳的保護環境，而親水端的部分會形成外殼，外殼能保護微胞不被網狀內皮系統的攻擊^[2]，以往的研究亦證實以高分子微胞攜帶藥物，增加疏水性藥物的溶解，透過主動或被動的藥物輸送機制，能減少藥物治療的給藥量，並避免不必要的副作用，許多研究證明利用藥物控制釋放系統可以有效提高藥物的安定性與效率^[3-4]。

第一個樹枝狀高分子合成的例子是 Vogtle 在 1978 年所發表，當時由核心向外發散之方式所合成的樹枝狀高分子受到矚目，因此他將重覆合成步驟命名為「Cascade Synthesis」意謂由內向外逐步合成^[5]。直到 1985 年，Tomalia 的 PAMAM dendrimer^[6]和 Newkome 的「Arborol」發表^[7-8]，樹枝狀高分子才廣泛的被重視。到了 1990 年，Fréchet^[9-11]發表了以收斂的方式，由外環支架結構的分子逐步依序往架構的內層方向逐步聚合，因其合成方式與先前的合成例子比較而言較容易得到樹枝狀高分子架構，並且在純化上和鑑定上也較為容易，受到廣

大的使用。另外，也因為樹枝狀高分子在合成方面較複雜，而往往導致生產成本高，在於商業上將會是個阻礙，因此在樹枝狀高分子的合成中，不斷發展新的快速合成方式和朝向更高代的樹枝狀高分子組裝^[12-13]

聚乳酸甘醇酸 (PLGA) 具有可水解性的長鏈脂族聚酯形成微粒系統來控制藥物釋放，最舉有發展性的潛能。 PLGA 材料結構上之 PLA 單體具有一個甲基，會使得材料整體結構較為疏水，可減緩酯鍵遭到水分子攻擊鍵結的機率，從而降低降解速率。其材料具有適當的機械性質及可調控降解的時間，易控制加工製備成各式生醫材料，並具有一致性。已被廣泛應用在醫學上或藥學上，有許多的形式已被美國食品及藥物管理局 (FDA)^[14] 所認可。由 PLGA 為基礎的微粒與傳統藥物相比之下提供許多重要的優勢，例如為：(1)準確地控制藥物的釋放速率並且延長了藥物釋放的時間；(2)使用方法較容易；(3)具有良好的生物相容性；(4)生物體能完全降解。這就是為什麼這種類型的先進的藥物遞送系統的實際重要性正在穩步增加^[15]。 PLGA 共聚物在體內之降解，主要是經由聚酯類聚合物鏈中的酯鍵因水解而裂解，此水解反應的進行導致酯末端基 (-COOH) 增加，隨著酸性增加，產生自身催化的作用。成乳酸 (lactic acid) 和乙醇酸 (glycolic acid) ，這些單體在體內很容易經由三羧酸循環代謝成二氧化碳及水分子而排出體外，其分解產物不會殘留於體內^[16-17]。

薑黃素有廣泛的藥理活性降膽固醇、高抗氧化能力、抗發炎、抗糖尿病、抗粥狀動脈硬化、抗血栓、抗腫瘤細胞轉移、抗關節炎在細胞培養與動物實驗研究中^[18]。有研究指出薑黃素能夠抑制發炎反應的細胞激素，如 nuclear factor kappa beta (NFκB)， peroxisome proliferator-activated receptor-γ(PPAR-γ) 和 signal transducer and activator of transcription-1 (STAT-1)^[19-20]，並且能抑制多種癌細胞的如乳癌、子宮頸癌等增生^[21]。薑黃素在人類臨床實驗中已發現是安全及有效的，也被美國食品藥品管理局(FDA)認證為安全之化合物。雖然薑黃素對人類許多疾病都具有療效，但薑黃素在水中溶解性差，生物利用度低，主要似乎是於體內的

吸收不良，降解速率快及高代謝率造成為，故為了增加薑黃素的利用率，於是開發了一種奈米型藥物載體，如微脂粒(liposomes)^[22]、微胞(micelles)、奈米微粒(nanoparticle)、水膠 (hydrogel) 等藥物輸送系統。在此類的藥物輸送系統中發現能增加薑黃素的溶解性，也提高了穩定性與生物利用度，而也改善細胞的攝取，提高癌細胞的治療結果。

第三章 實驗材料與方法

3-1 實驗材料

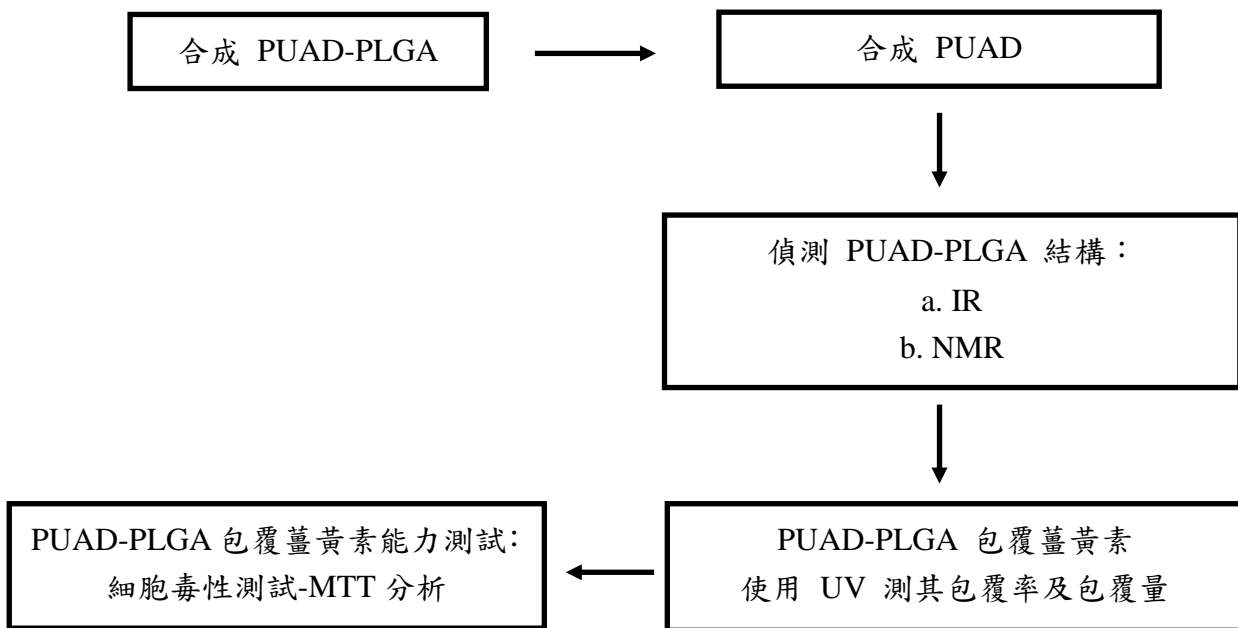
- (1) 1,6-diisocyanatohexane ; Sigma-Aldrich
- (2) Triethanolamine,98% ; Panreac
- (3) N,N-dimethylformamide(DMF) ; J.T.Baker
- (4) Ethyl ether,99.7% ; J.TBaker
- (5) Thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT) ; Alfa
- (6) Ethyl isocyanatoacetate,98% ; Arcros Organics
- (7) Chlorform ; Sigma
- (8) 1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide(EDC) ; Alfa aesar
- (9) N-Hydroxysuccinimide(NHS) ; Alfa aesar
- (10) Polylactide-co-glycolide(PLGA) ; Sigma
- (11) Dimethyl sulfoxide(DMSO) ; Sigma
- (12) Dialysis membranes,3500MWCO ;
- (13) Dichloromethane ; J.T.Baker
- (14) n-Hexane ; Macron-Chemical

3-2 實驗器材

- (1) 電磁加熱攪拌器; Heidolph,MR-Hei-Standard,Germany
- (2) 微量電子天平; Sartorius,TE214S,Germany

- (3) 離心機; HSIANGTAI
- (4) 超音波震盪器; Prema,DC-400,Germany
- (5) 傅利葉紅外線光譜儀; PERKIN-ELMER-824
- (6) 核磁共振光譜儀; Bruker 200 MHz NMR
- (7) 雙光束分光光譜儀; HITACHI U-2900
- (8) 冷凍乾燥機; KINGMECH-FD2-6P
- (9) 透析膜; Cellu Sep
- (10) 迴轉濃縮機; Buchi Rotavapor RE111,Switzerland
- (11) 均質機; CHEMIST SCIENTIFIC CORP

3-3 實驗流程



3-4 兩性共聚物合成

3-4.1 製備樹枝狀聚胺基甲酸酯 (PUAD) 高分子

第一步將反應物 Triethanolaminec 和 1,6-diisocyanatohexane 以莫耳數比 1 : 8 及適量的 DMF 加入雙口反應瓶內，並通入氮氣，加熱到 60°C(±3°C)、250rpm 攪拌，反應時間為三小時，待反應時間到後，反應物由正己烷進行離心純化，分離出透明的沉澱物為 G 0.5 。取樣測 FT-IR 確認產物是否已反應成功，再進行下一個合成步驟。

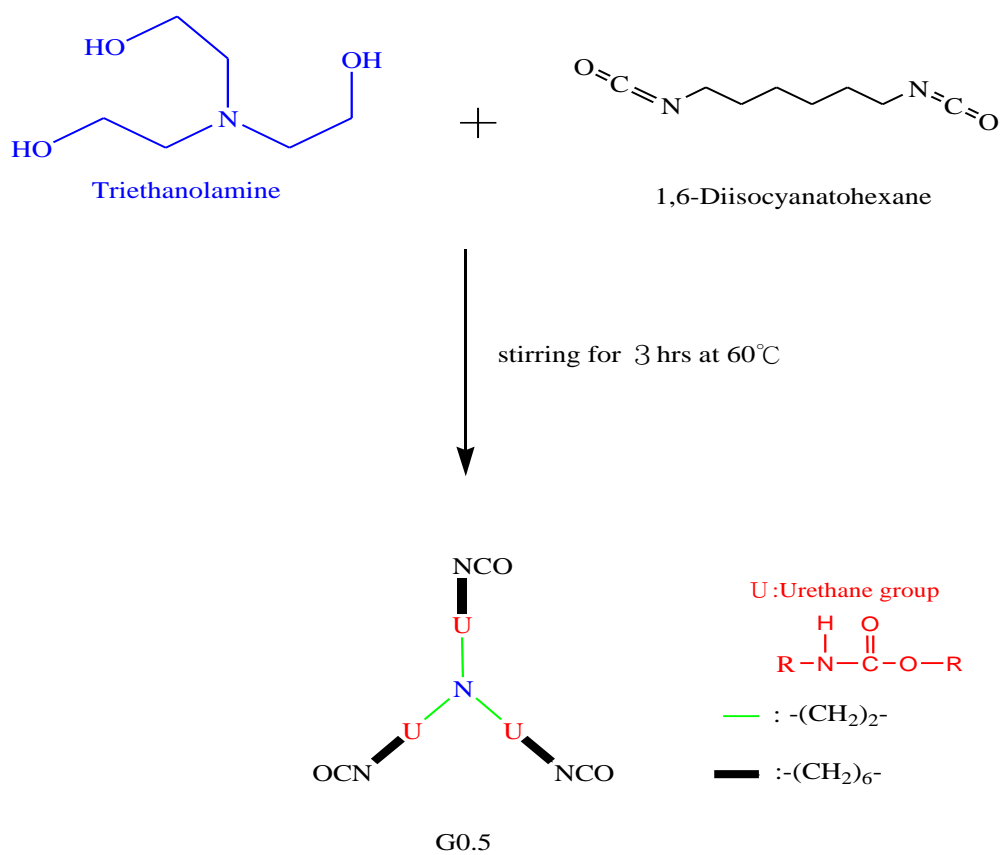


圖 1、G0.5 PUAD 合成流程圖

第二步將反應物 G 0.5 及 Triethanolamine 以莫耳數比 1:8 及適量的 DMF 加入雙口反應瓶內，並通入氮氣，加熱到 60°C(±3°C)、250rpm 攪拌，反應時間為三小時，待反應時間到後，反應物由乙醚進行離心純化，分離出透明的 G1.0 沉澱物。取樣測 FT-IR 確認產物是否已反應成功，再進行下一個合成步驟。

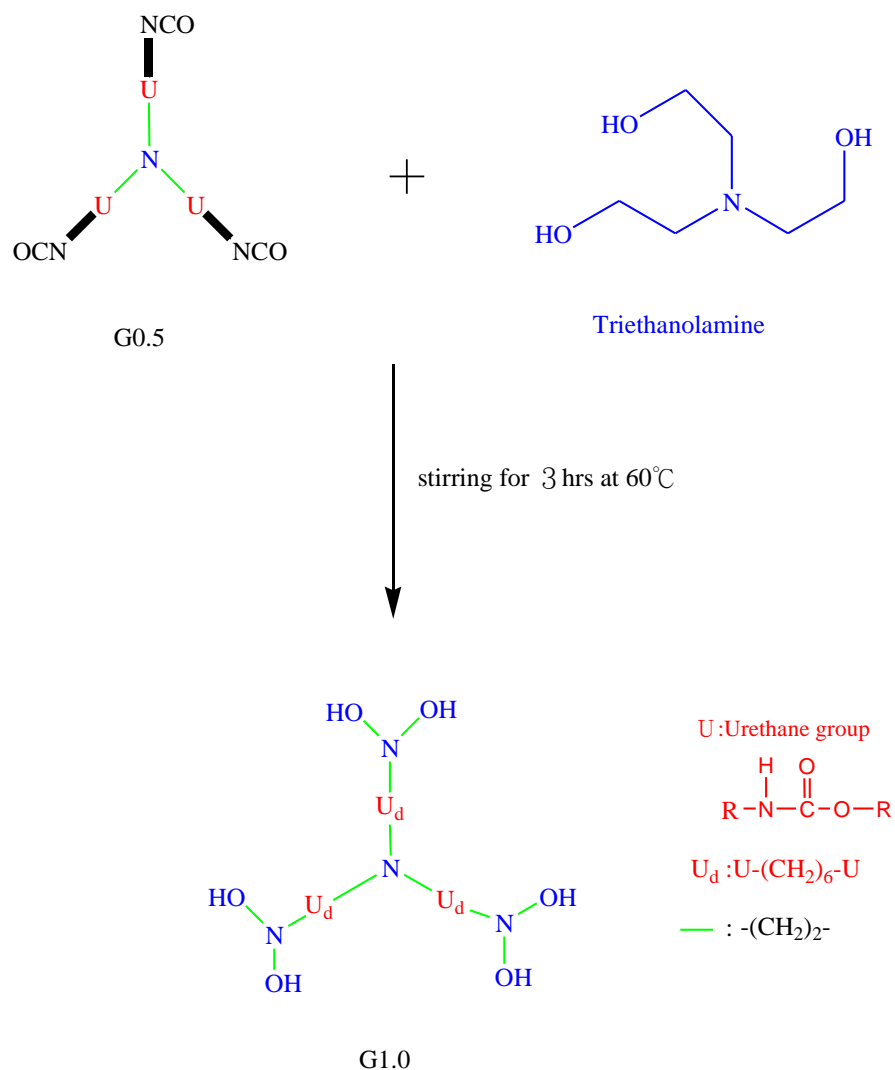


圖 2、G1.0 PUAD 合成流程圖

第三步將反應物 G 1.0 和 1,6-diisocyanatohexane 以莫耳數比 1 : 15 及適量的 DMF 加入雙口反應瓶內，並通入氮氣，加熱到 60°C(±3°C)、250rpm 攪拌，反應時間為三小時，待反應時間到後，反應物由正己烷進行離心純化，分離出透明 G 1.5 的沉澱物。取樣測 FT-IR 確認產物是否已反應成功，再進行下一個合成步驟。

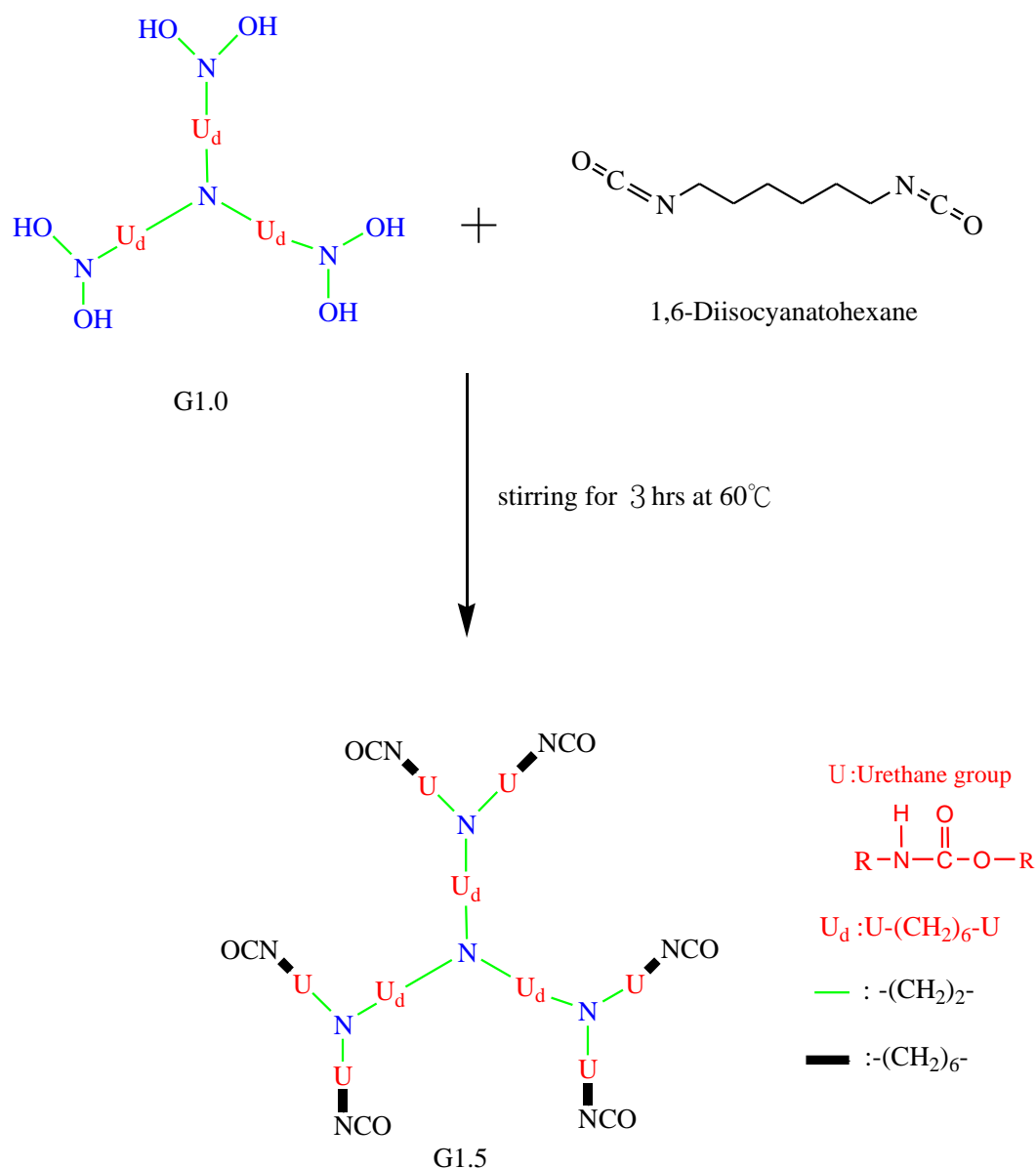


圖 3 、G1.5 PUAD 合成流程圖

第四步將反應物 G 1.5 和 Triethanolamine 以莫耳數比 1:10 及適量的 DMF 加入雙口反應瓶內，並通入氮氣，加熱到 60°C(±3°C)、250rpm 攪拌，反應時間為三小時，待反應時間到後，反應物由乙醚進行離心純化，分離出透明的 G 2.0 沉澱物。取樣測 FT-IR 確認產物是否已反應成功，再進行下一個合成步驟。

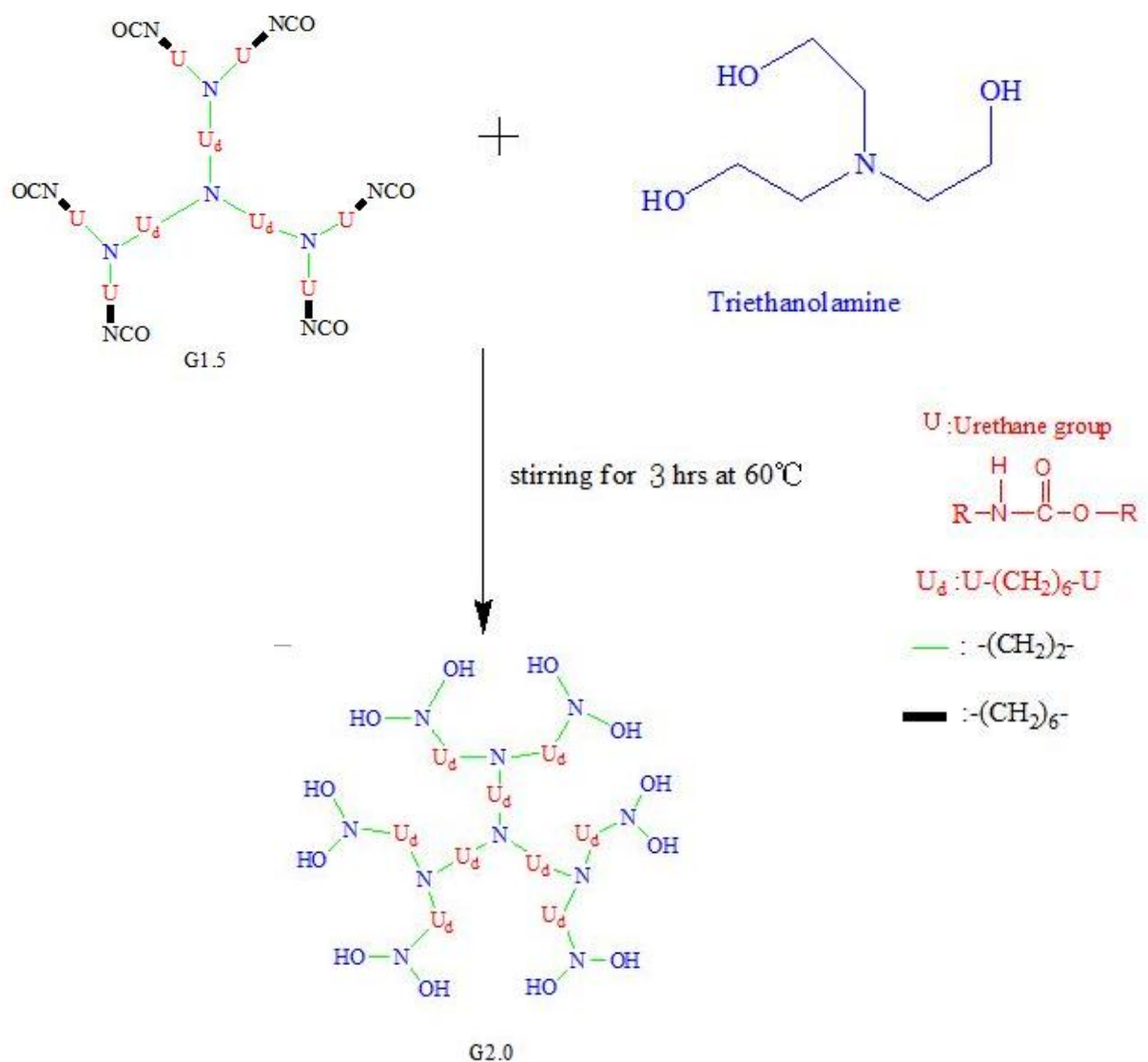


圖 4、G2.0 PUAD 流程圖

第五步將反應物 G 2.0 和 1,6-diisocyanatohexane 以莫耳數比 1 : 40 及適量的 DMF 加入雙口反應瓶內，並通入氮氣，加熱到 60°C(±3°C)、250rpm 攪拌，反應時間為三小時，待反應時間到後，反應物由正己烷進行離心純化，分離出透明的 G 2.5 沉澱物。取樣測 FT-IR 確認產物是否已反應成功，再進行下一個合成步驟。

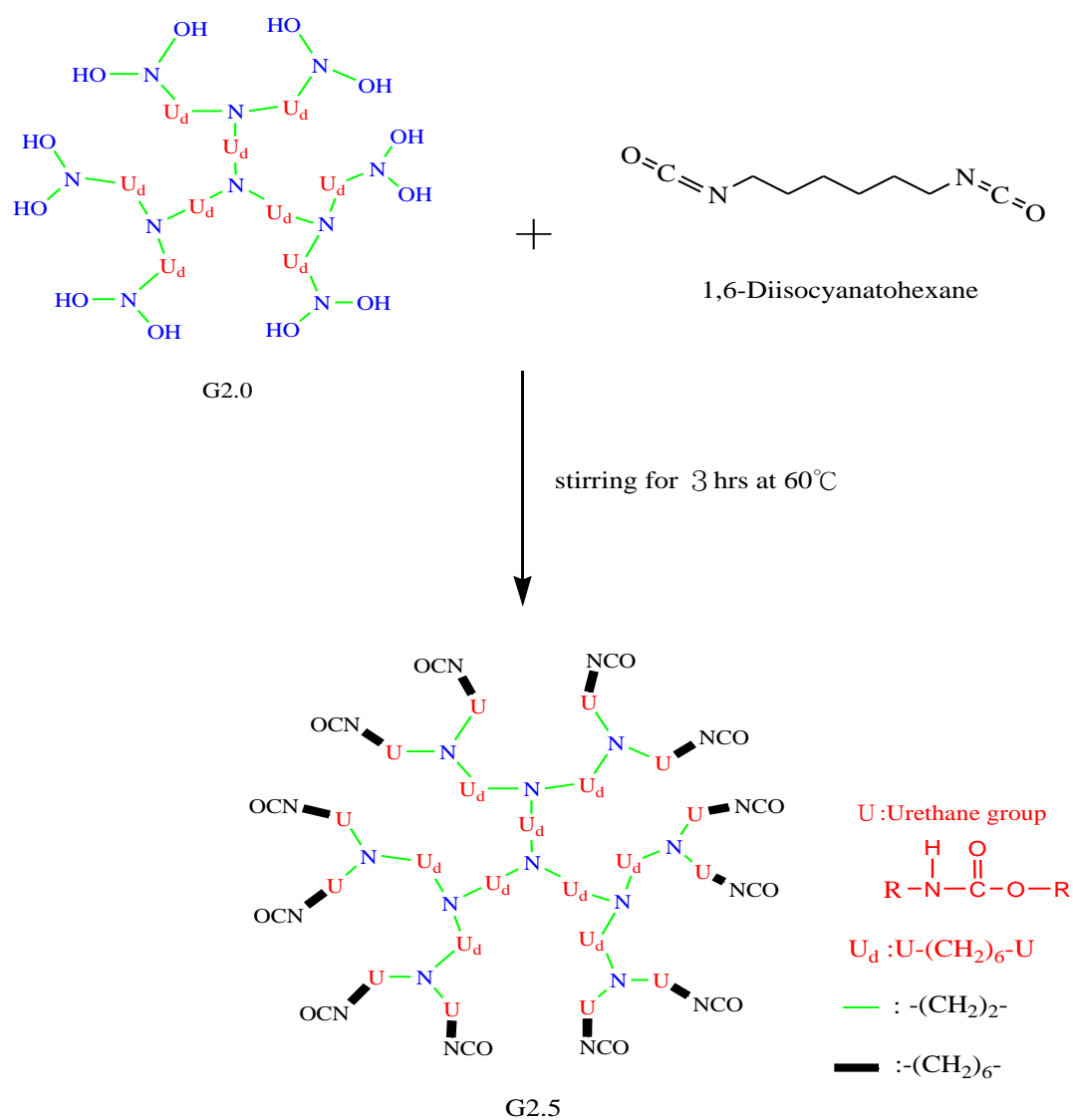


圖 5、合成 G2.5 PUAD 流程圖

第六步將反應物 G 2.5 和 Triethanolamine 以莫耳數比 1 : 50 及適量的 DMF 加入雙口反應瓶內，並通入氮氣，加熱到 60°C(±3°C)、250rpm 攪拌，反應時間為三小時，待反應時間到後，反應物由乙醚進行離心純化，分離出透明的 G 3.0 沉澱物。取樣測 FT-IR 確認產物是否已反應成功，再進行下一個合成步驟。

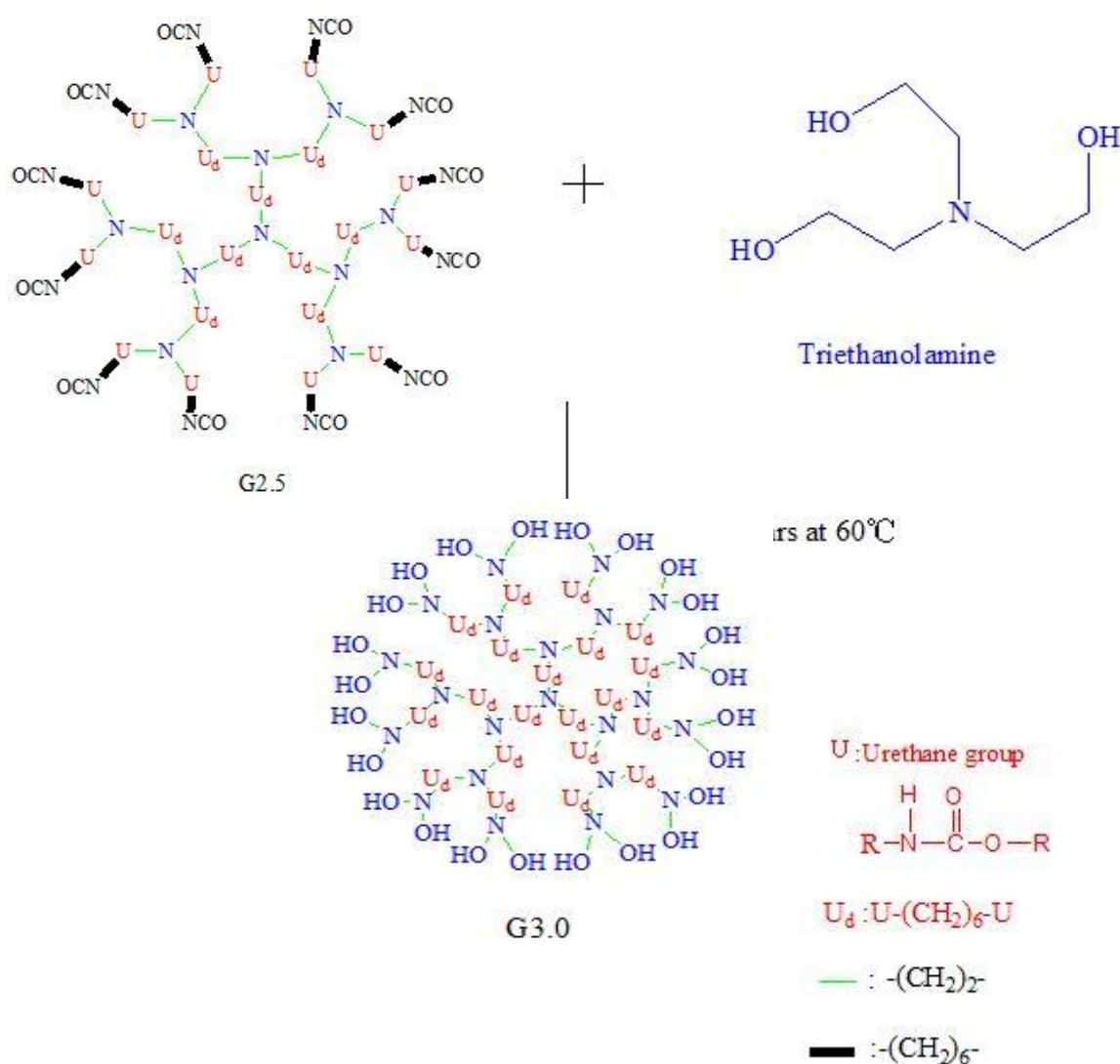


圖 6、G3.0 PUAD 合成流程圖

第七步將反應物 G3.0 及 Ethyl isocyanatoacetate 以莫耳數比 1 : 50 及適量的 DMF 加入雙口反應瓶並通入氮氣，此步驟必須全程避光，加熱 45°C、250 rpm 攪拌，反應時間為三小時，待反應時間結束後，將反應物由乙醚進行純化，離心分離出沉澱物。取樣測 FT-IR 確認產物是否已反應成功，再進行下一個合成步驟。

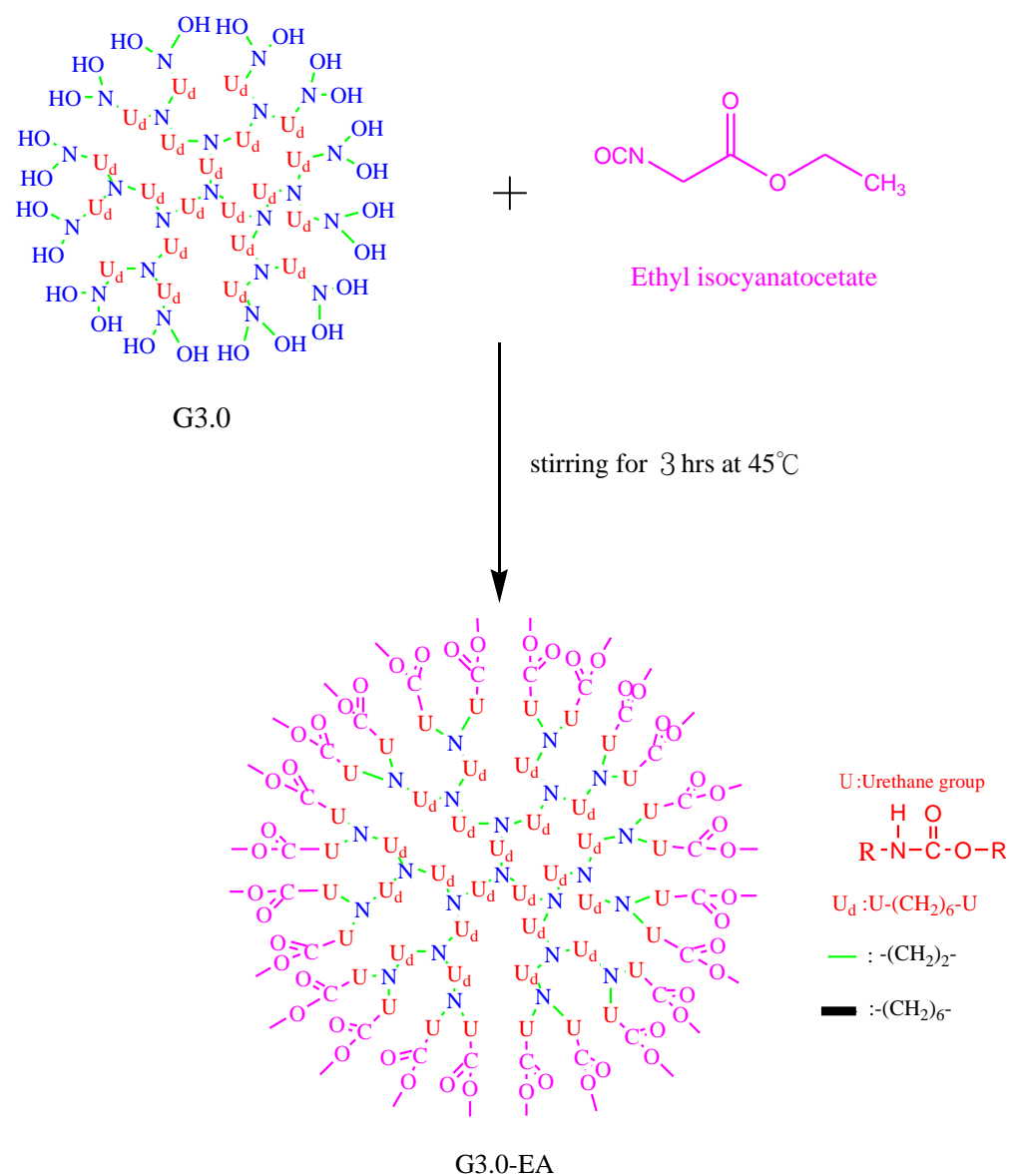


圖 7、G3.0 PUAD-EA 合成流程圖

第八步將反應物以莫耳數比 1 : 100 及適量的 DMF 加入單口反應瓶內進行合成，加熱 60 °C、250 rpm 攪拌，反應時間為五小時，待反應時間結束後，將反應物進行透析，使用透析膜（MWCO 6000~8000）與去離子水（1:500）在室溫下透析 24 小時，再將透析帶內的澄清溶液取出，以冷凍乾燥的方式移除水分。取樣測 NMR、FT-IR 確認產物是否反應成功，再進行下一個合成。

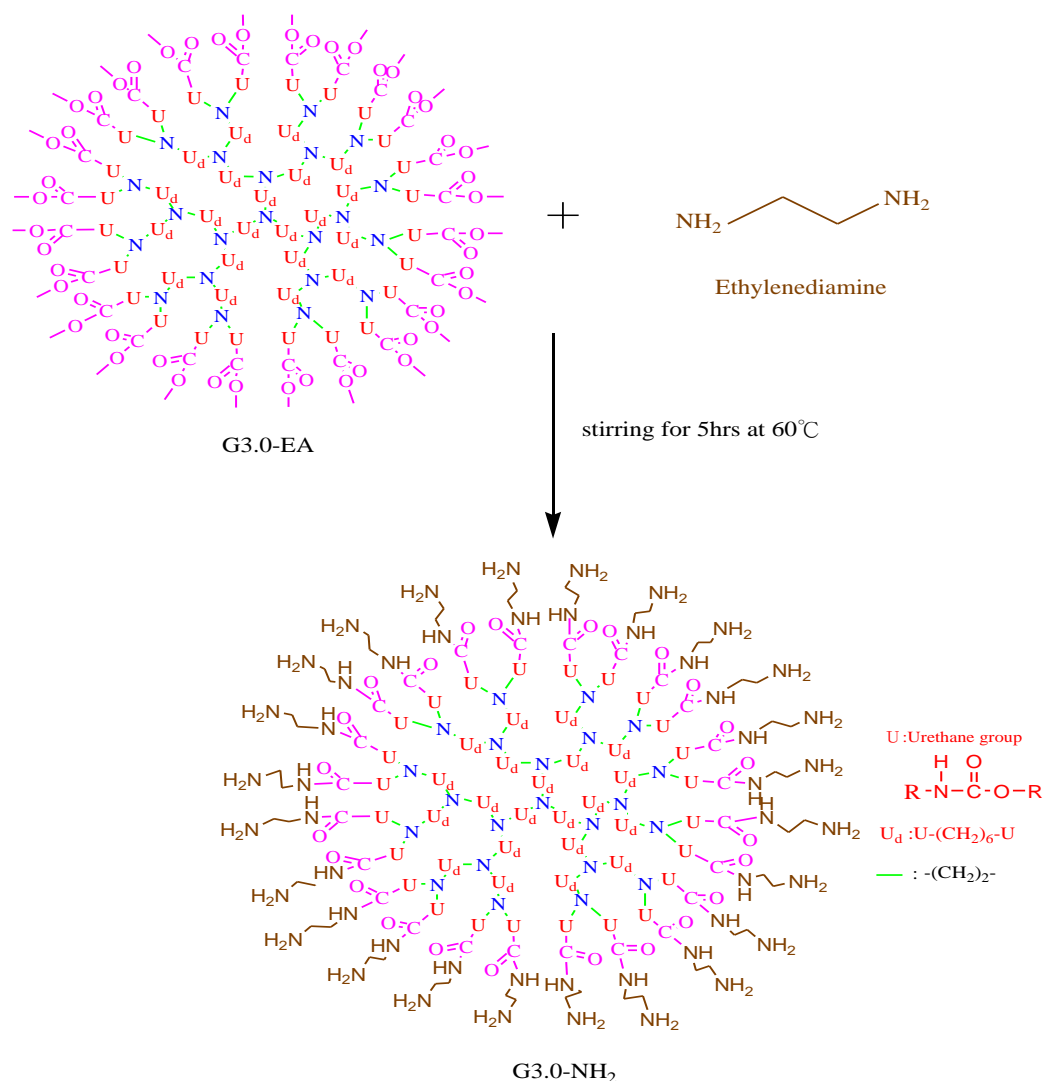


圖 8、G3.0 PUAD-NH₂ 合成流程圖

3-4-2 製備 PUAD-PLGA

合成 PUAD-PLGA 須先將 PLGA 末端 COOH 基，以 EDC/NHS 進行活化，材料秤取完後以少量的 DMF 為溶劑，在室溫下反應瓶內磁石攪拌速度設為 200 rpm 反應四小時，使得 PLGA 末端與 NHS 結合，活化後加入 PUAD-NH₂，

於室溫下反應 24 小時，攪拌速度設 300 rpm，使得 PLGA 之羧基脫去其 OH 基，PLGA 之 NH 基脫去一個 H 原子，使兩者結合形成醯胺鍵，後以透析的方式將產物純化，使用透析膜 (MWCO：12000-14000) 透析 24 小時，將上清液冷凍乾燥後，可得到最終產物 G 3.0 PUAD-PLGA。

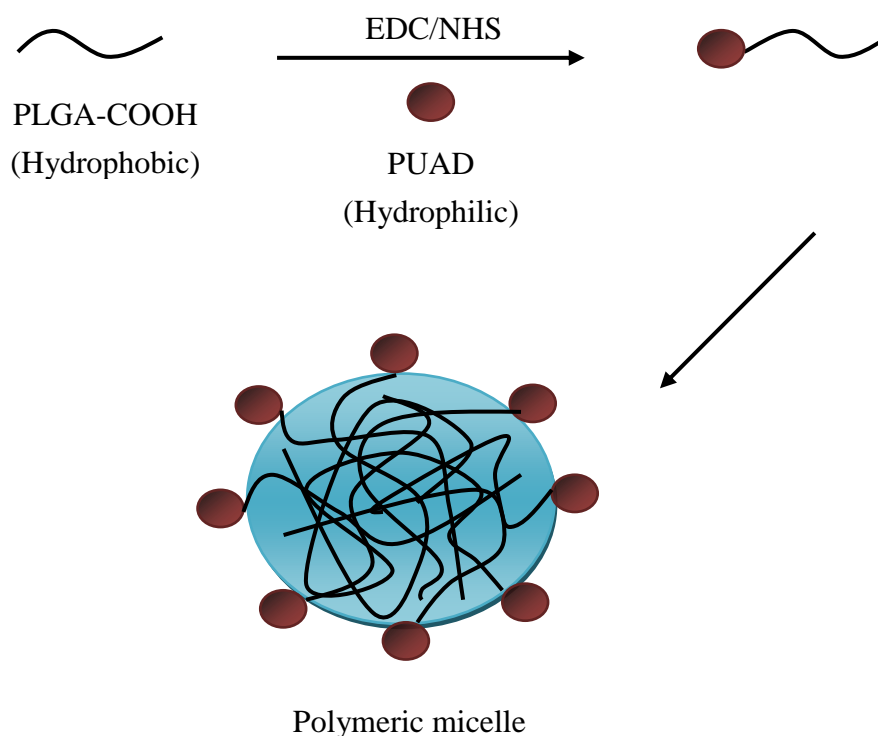


圖 9、PUAD-PLGA 合成示意圖

3.4-3 微胞的製備溶劑蒸發法

利用溶劑蒸發法來探討微胞對於 curcumin 包覆效率之研究。秤取不同比例之材料 (mg) 與不同比例之 curcumin (mg)，依序為 10 比 5、10 比 10、10 比 20 分別置於 20 mL 的樣品瓶內，共同溶於 1 ml 丙酮中，並震盪、攪拌至隔夜，再緩慢滴入 5 倍 DI water (MQ 水)中，於室溫緩慢攪拌六小時，並打開瓶蓋讓丙酮揮發，再以迴轉濃縮儀抽三十分鐘左右，抽取剩下殘餘的丙酮溶劑，將樣品移置到微量離心管中進行 9000rpm、十分鐘離心後，將上清液取 100 μ l 至樣品瓶加入 900 μ l 丙酮，稀釋 10 倍後，以 UV 測定未包覆的藥物濃度含量，設 426 nm 對樣品進行光吸收密度測量，數值對照標準曲線後，可得知未被包覆的 curcumin 藥物濃度，並探討在何種比例下材料包覆藥物的能力最佳。

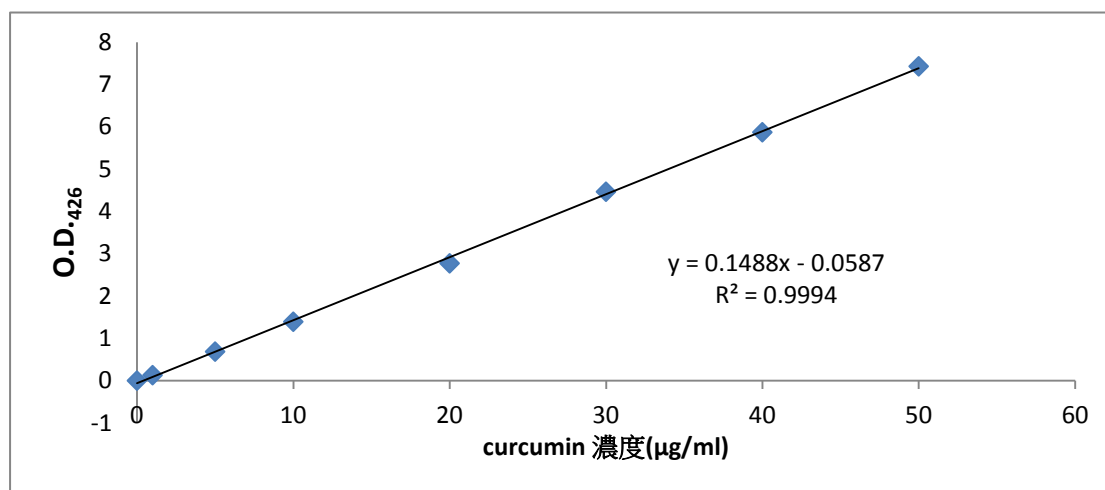


圖 10、薑黃素的標準曲線

利用以下兩個公式來測得藥物包覆效率與包覆藥物含量：

$$\text{Encapsulation rate (\%)} = \frac{\text{Drug in micelles (mg)}}{\text{Initial loading drug (mg)}} \times 100\%$$

$$\text{Loading capacity (mg/mg)} = \frac{\text{Weight of curcumin in micelles}}{\text{Weight of micelles}} \times 100\%$$

3-4-4 FT-IR 結構分析

紅外線光譜儀的原理是分子中的官能基產生分子間振動或轉動時，會吸收適當的紅外光能量而得到的光譜，FT-IR 的原理是利用干涉儀產生干涉光譜經傅利葉轉換成 IR 的光譜。由 IR 光譜中可以得到共聚物官能基的振動光譜及定量的分析。

紅外光運用在化學分析的領域上時，如將設定某一頻率範圍（通常在 4000 – 400 cm^{-1} 之間）的紅外光通過代測樣品，偵測被吸收掉的紅外光頻率，來推測產物的官能基是否正確。

偵測前會先將樣品溶於氯仿溶劑中，適當滴在 KBr 鹽片上，溶劑揮發後掃描，判斷官能基的位置。

3-4-5 核磁共振光譜儀 ($^1\text{H-NMR}$) 分析

觀測原子的方法是利用氫原子核磁共振光譜儀 ($^1\text{H-NMR}$)，來鑑定兩團聯共聚物之化學結構。核自旋本身的磁場，在外加磁場下大多數核自旋會處於低能

量。再額外施加電磁場來干涉低能態的核自旋轉向高能態，再回到平衡態，而釋放出射頻，此射頻波的頻率即兩能階間的差異，這就是 NMR 訊號。利用這樣的過程，可以進行分析分子結構。將少量樣品放置於直徑 5 mm 的玻璃管柱中，以各種氘取代氫溶劑溶解後，於核磁共振儀進行氘譜掃描。

3-4-6 粒徑分析

粒徑分析是以 (DTS Malvern Nano-ZS) 使用一 5 Mw 之低功率氦氖雷射光 (波長 633 nm) 做分析。其原理是利用粒子在水中所產生布朗運動，當雷射光打到粒子時，會造成散射光頻率的改變，此散射光頻率的改變跟粒子的大小有關，粒子大的運動頻率較粒子小的慢，所引起的波動頻率的改變也因較小的粒子所造成的變化較小；因此透過偵測光強度波動頻率改變的現象，來判定水溶液中粒子的粒徑大小，以 Einstein-Stokes 方程式來計算出粒徑大小。

Einstein-Stokes equation :

$$R_H = kT/6\pi\eta D_{AV}$$

R_H : 水合半徑

η : 黏度 (poise)

k : 波茲曼常數

T : 絕對溫度 (k)

D_{AV} : Brownian Diffusivity

3-5 細胞試驗

3-5-1 細胞種類

COS-7 細胞株：為一種經 SV40 轉型 (transform) 的非洲綠猴子腎臟表皮細胞，其為貼覆性細胞，ATCC細胞編號為：CRL-1651。

3-5-2 培養基配置

將兩瓶各 600 mL MQ 水滅菌備用。先將 DMEM 粉末 (13.4 g) 溶於其中一瓶 600 mL MQ 水中，完全溶解後加入 2.2 g NaHCO_3 ，攪拌使溶解。溶解後以 1 N NaOH 或 1 N HCL 調整 pH 值為 7.2 ± 0.1 。調整完後將水補至 1000 mL，並以 0.22 μm 濾膜過濾到滅菌血清瓶中。細胞培養液需含 10% FBS 和 1% penicillin、streptomycin、amphotericin 抗生素，並保存於 4°C 中。

3-5-3 細胞培養與繼代

培養於 flask 之細胞以顯微鏡觀察細胞生長的情況。當 flask 內之細胞達到 8 至 9 成滿，即可進行繼代。將 flask 中舊的培養基完全吸除後，以 5 mL 1X PBS 清洗整個培養區域，沖洗殘餘死去的細胞及廢棄物，再將 PBS 吸除，加入 1 mL Trypsin-EDTA，切起貼覆的細胞，將 flask 置於 37°C、5% CO_2 培養箱 5 分鐘，加入 4 mL 培養液終止 Trypsin-EDTA 作用，並和混合切除細胞混合均勻。將溶液全部吸取放入 15 mL 離心管中，以 2000 rpm 離心 3 分鐘，直接吸掉上層培養液，加入 5 mL 培養液並以微量吸管以抽取方式將底部的細胞團完全打散，取 1 mL 細胞液加入 8 mL 新的培養液，放入 37°C、5% CO_2 培養箱進行細胞培養。

3-6 MTT 分析細胞毒性測試

3-6-1 原理

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 分析是一種生物學上常用以測定細胞存活率或增殖作用的方法；其主要依賴核細胞內粒線體中的 dehydrogenase 之作用將 MTT 之 tetrazolium 轉為紫色不溶於水的產物 MTT formazan，結晶於細胞的粒線體中。當加入 DMSO 將其溶解，則可利用 ELISA reader 測 OD 值 570 有最高的吸收值，藉 OD 值得知細胞還原 MTT 的能力 (formazan 形成量)，此讀值代表了粒線體的活性，亦間接代表活細

胞的數目，故 MTT assay 可用作細胞存活率的指標^[23]。

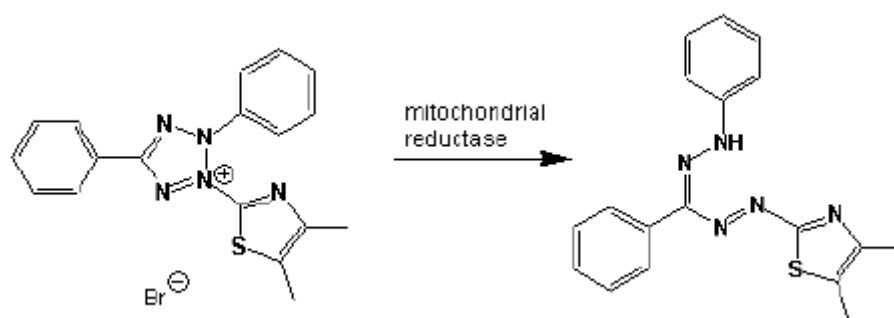


圖 11、MTT 與 NADH 的反應機制

3-6-2 實驗方法

將 COS-7 細胞種於 96 well 中，5000 顆細胞 / 100 μ l / well，培養於 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 培養箱內至隔夜。隔天將舊的 medium 抽掉，換上不同濃度裝載藥物的 Dendrimers 以及 Free 藥物（1、5、10、25、50 μ g/mL），裝載藥物的 Dendrimers 以 medium 當作溶劑配置各濃度，然而，薑黃素較不容於 medium，故會由含有 1 % DMSO 的 medium 配置，並培養 24、48 小時。時間到後抽掉含有 Dendrimers 的 medium，用 1X PBS 洗一次。加入含有 0.5 mg/mL MTT 的 medium，培養 2 小時。時間到後抽掉 medium，加入 100 μ l DMSO 以 ELISA 測 OD 570 nm。

第四章 結果與討論

4-1 兩性共聚物結構鑑定分析

4-1-2 G0.5 PUAD、G1.5 PUAD、G2.5 PUAD FT-IR 光譜鑑定

G0.5、G1.5、G2.5 之最外圍官能基為 NCO，其 IR 光譜圖為圖 12，主要吸收峰為 3327 cm^{-1} (N-H, urethane)、 2272 cm^{-1} (NCO, isocyanate)、 1700 cm^{-1} (C=O, urethane)。

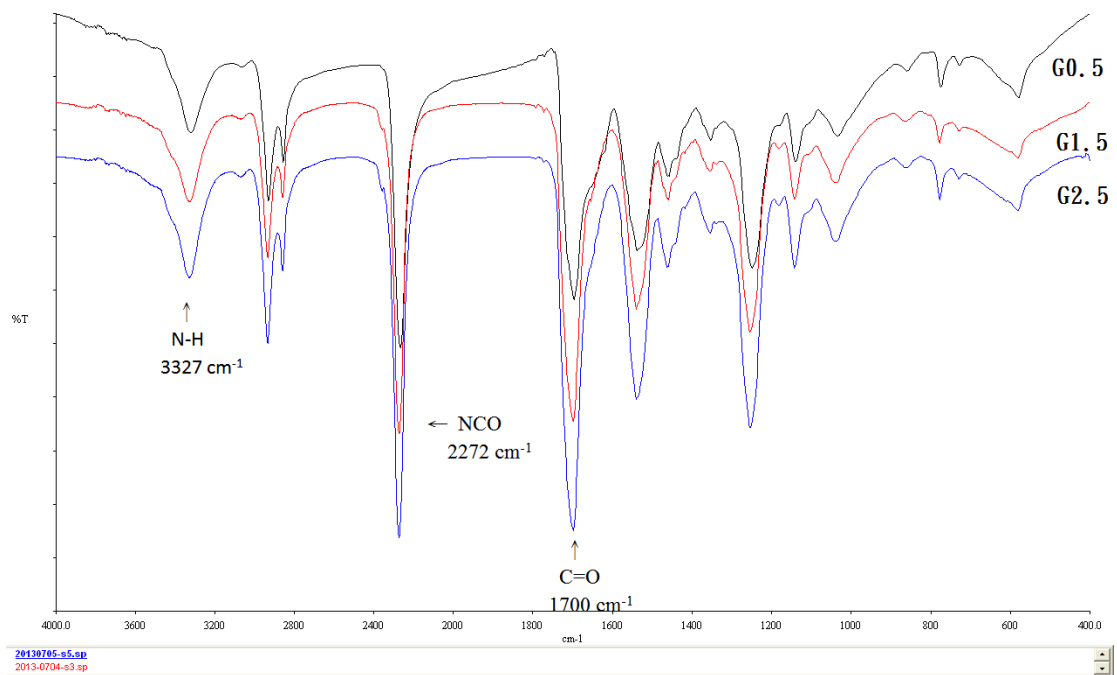


圖 12、G0.5 PUAD、G1.5 PUAD、G2.5 PUAD FT-IR 光譜圖

4-1-3 G1.0 PUAD、G2.0 PUAD、G3.0 PUAD FT-IR 光譜鑑定

G1.0、G2.0、G3.0 之最外圍官能基為 O-H，其 IR 光譜圖為圖 13，其中主要的吸收峰為 3340 cm^{-1} (O-H)、 1699 cm^{-1} (C=O, urethane)。而 2272 cm^{-1} (NCO, isocyanate) 消失。

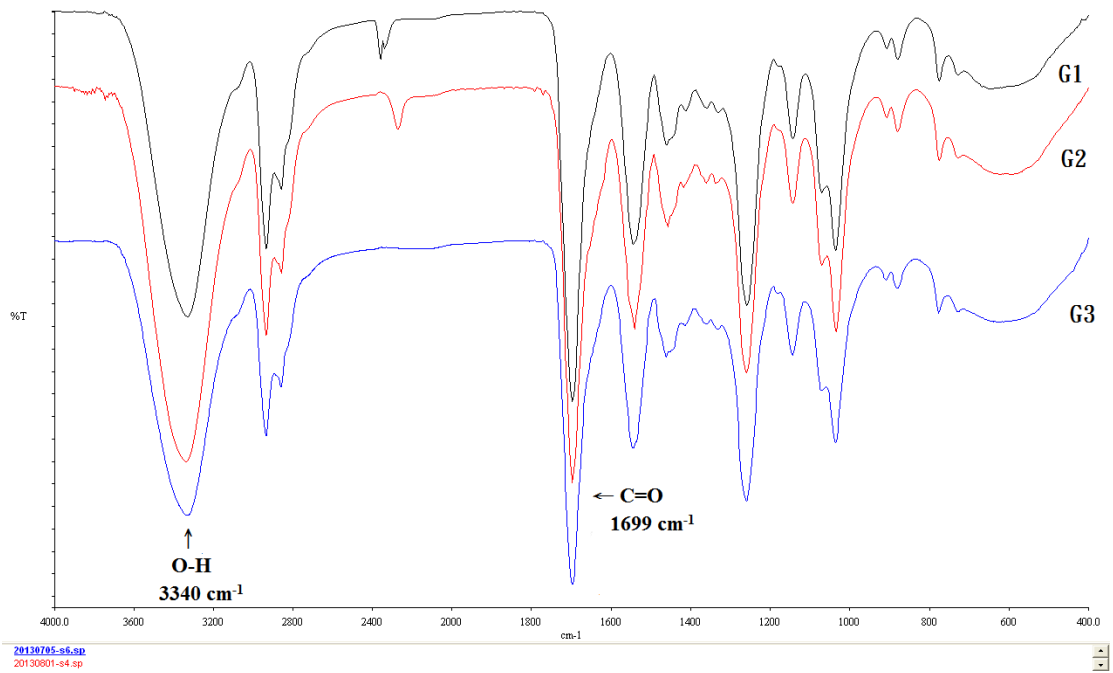


圖 13、G1.0 PUAD、G2.0 PUAD、G3.0 PUAD FT-IR 光譜圖

4-1-4 G3.0 PUAD-EA FT-IR 光譜鑑定

G3.0 PUAD-EA 樹枝狀高分子的外圍的官能基為 CH_3 ，IR 光譜為圖 14，主要吸收峰為 3334 cm^{-1} (N-H, amide)、 1747 cm^{-1} (C=O, Ethyl isocyanatoacetate)、 1700 cm^{-1} (C=O, urethane)、 1202 cm^{-1} (C-O, Ethyl isocyanatoacetate)。

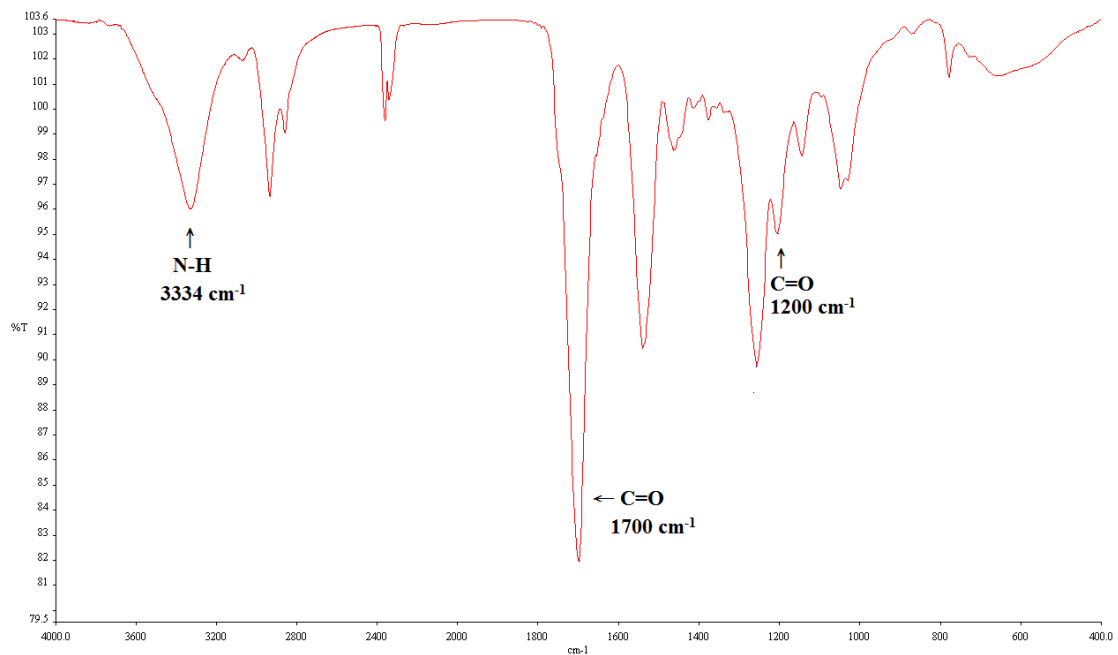


圖 14、G3.0 PUAD-EA FT-IR 光譜圖

4-1-5 G 3.0 PUAD-NH₂ FT-IR 光譜鑑定

G3.0 PUAD-NH₂ 樹枝狀高分子的外圍的官能基為 NH₂，IR 光譜為圖 15，主要吸收峰為 3327cm⁻¹(N-H, amide)、1701cm⁻¹ (C=O, urethane)，1655cm⁻¹(C=O, amide)。而 1747cm⁻¹(C=O, Ethyl isocyanatoacetate)與 1202 cm⁻¹(C-O, Ethyl isocyanatoacetate)隨反應消失。

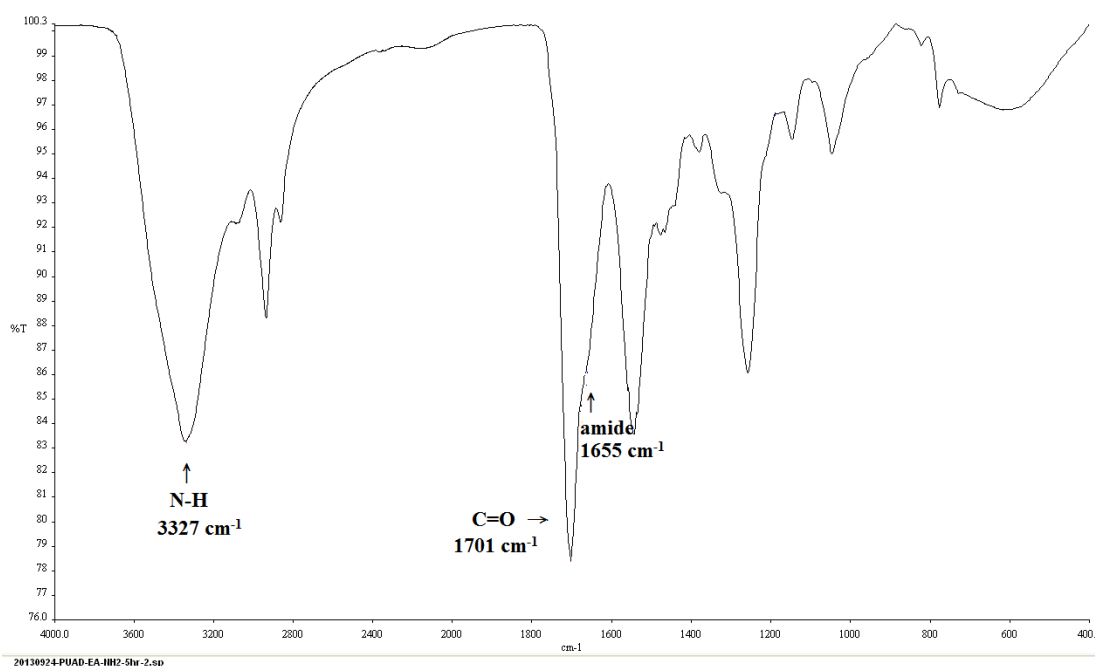


圖 15、G 3.0 PUAD-NH₂ FT-IR 光譜圖

4-1-6 G3.0 PUAD-PLGA FT-IR 光譜鑑定

G3.0 PUAD-NH₂ 樹枝狀高分子的外圍的官能基為 NH₂，主要吸收峰為 3323 cm⁻¹(N-H, amide)、1697 cm⁻¹ (C=O, urethane)，則 PLGA大約為 1758 cm⁻¹(C=O)、1093 cm⁻¹(C-O)，其 IR 光譜為圖 16。

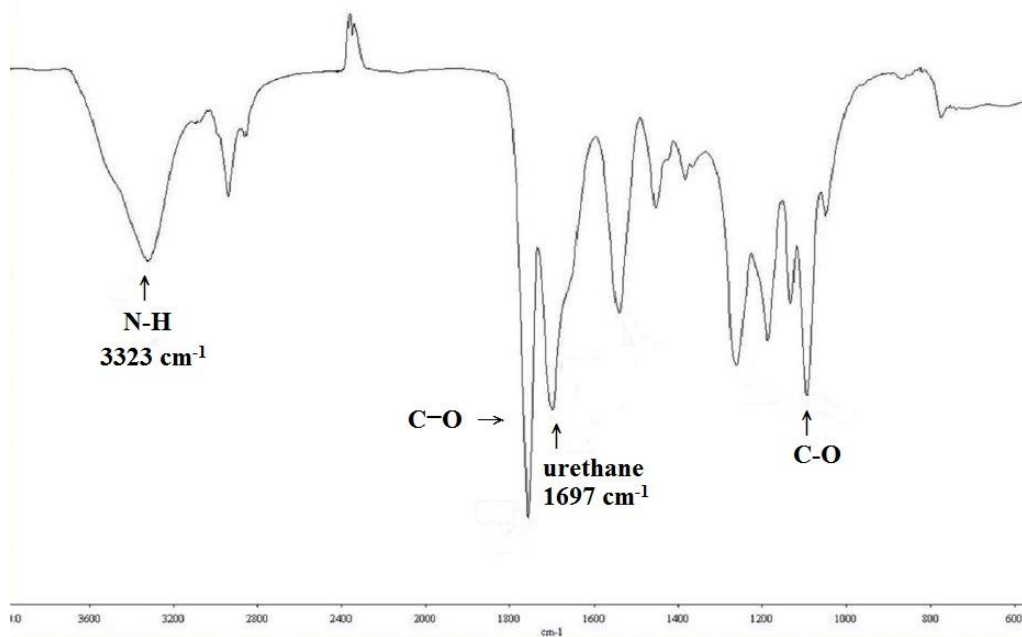
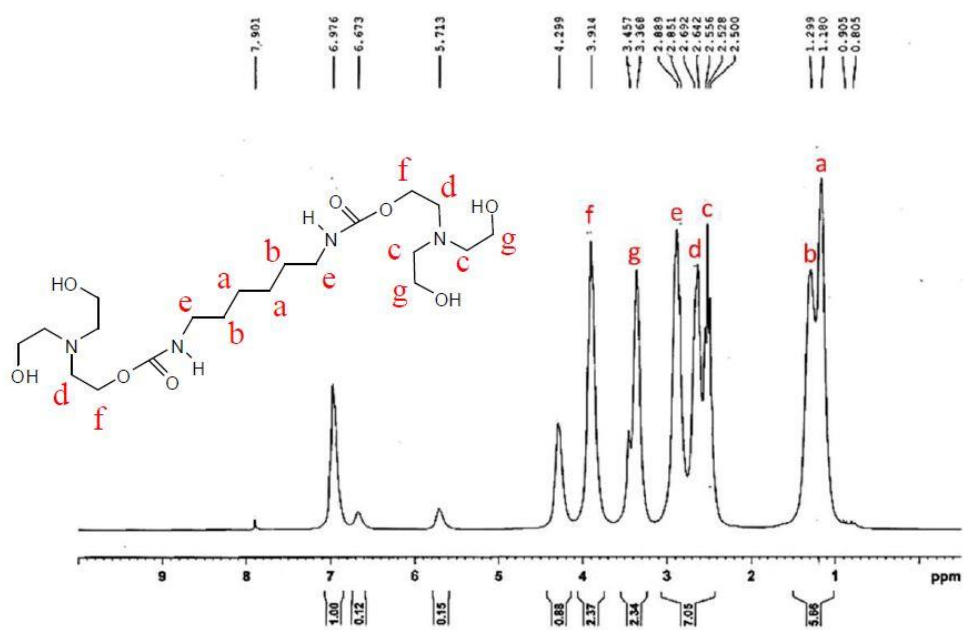


圖 16、G 3.0 PUAD-PLGA FT-IR 光譜圖

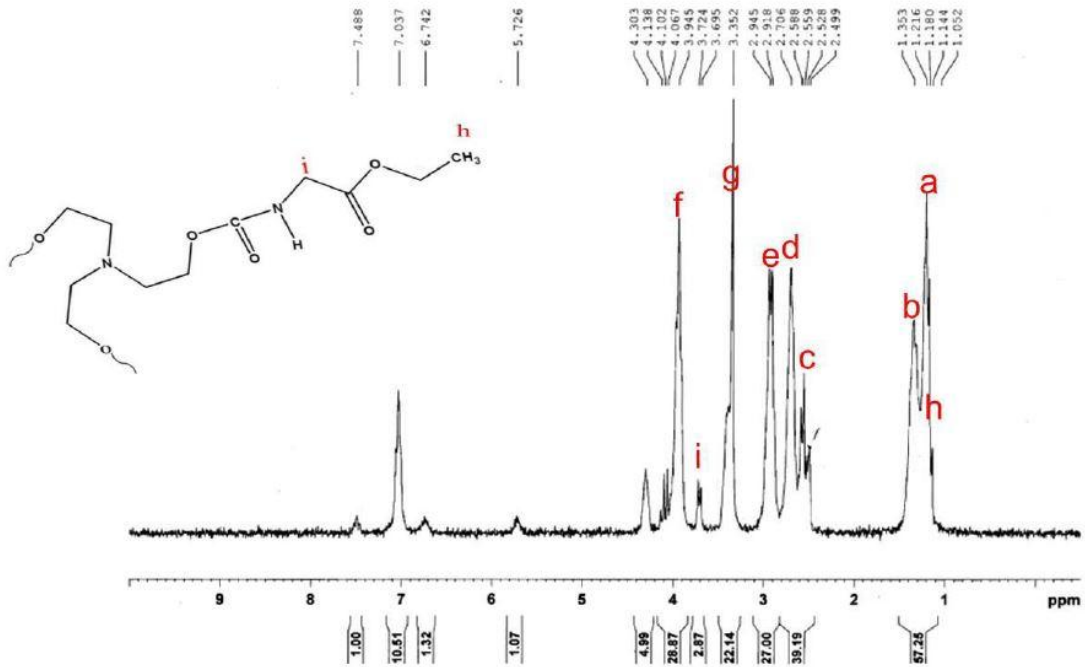
4-1-7 G3.0 PUAD-PLGA ¹H-NMR 光譜鑑定

藉由 ¹H-NMR 圖譜分析所合成之物質，比對在預測圖譜中合成物質所呈現的不同化學位移，可以確認所合成之物質結構上的 H 原子，從所測得的圖譜中確認是否成功合成出 G3.0 PUAD-PLGA 兩性共聚物。圖 17 至 20 為從 G3.0 PUAD 合成至 G3.0 PUAD-PLGA 之 ¹H-NMR 結構光譜圖。



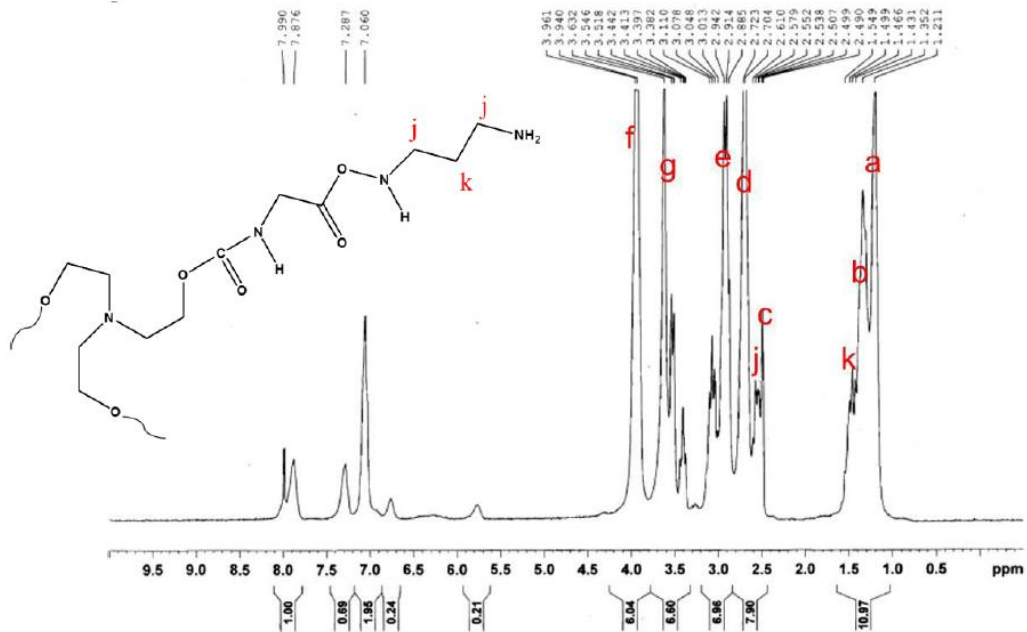
Types of proton	a	b	c	d	e	f	g	j	k
Chemical shift (ppm)	1.18	1.35	2.55	2.70	2.94	3.94	3.35	1.14	3.72

圖 17、G 3.0 PUAD ¹H NMR 光譜圖



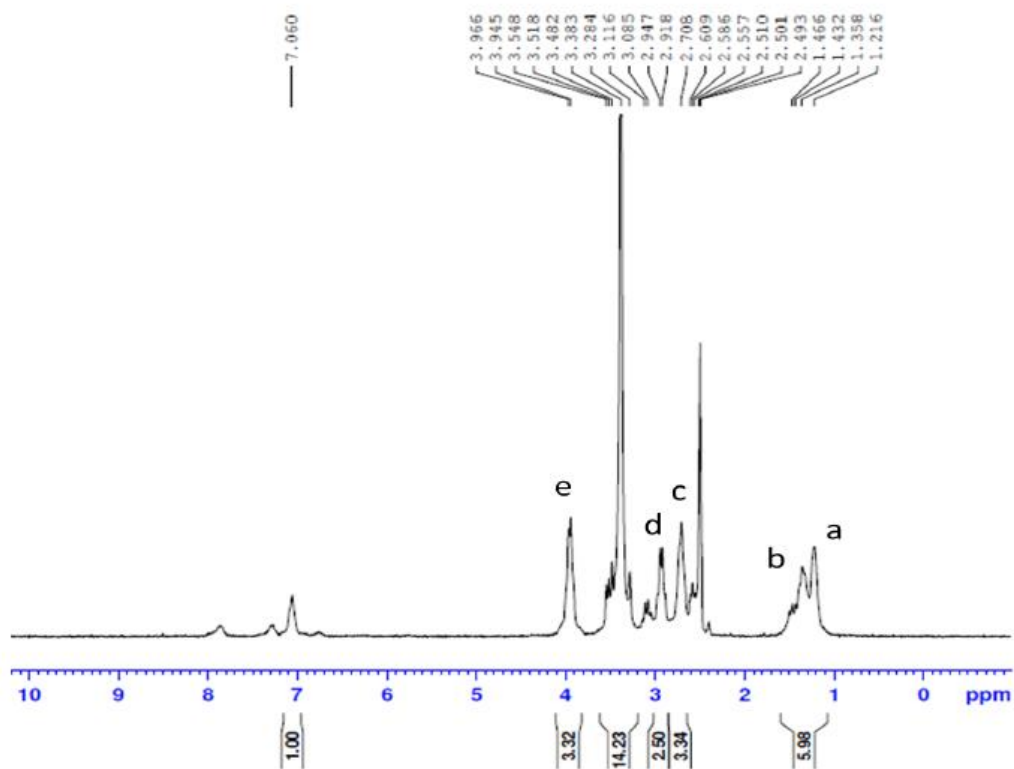
Types of proton	a	b	c	d	e	f	g
Chemical shift (ppm)	1.18	1.29	2.55	2.64	2.85	3.91	3.36

圖 18、G 3.0 PUAD-EA ¹H NMR 光譜圖



Types of proton	a	b	c	d	e	f	g	j	k
Chemical shift (ppm)	1.21	1.35	255	2.70	2.91	3.96	3.63	2.61	1.54

圖 19、G 3.0 PUAD-NH₂ ¹H NMR 光譜圖



Types of proton	a	b	c	d	e	f	g
Chemical shift (ppm)	1.17	1.31	2.60	2.68	2.88	3.94	3.34

圖 20、G 3.0 PUAD-PLGA ¹H NMR 光譜圖

4-2 藥物包覆效率

利用兩性高分子的特性，在水中會自組裝成微胞，經由疏水性的相互作用將難溶於水的薑黃素包覆在內部疏水性區域，裝載藥物的兩性高分子使用 UV/Visible 雙光束分光光譜儀進行分析，回推算出包覆藥物的含量以及包覆率。

由溶劑蒸發法來探討微胞對 curcumin 包覆效率之研究，實驗結果為圖23、24結果發現，當材料固定時，其包覆量 (Loading capacity) 會隨當初所稱取之薑黃素比例量而升高，由0.05853 mg 至 0.08071mg ，包覆率則反之，從 11.26 % 至 4.056 % 。

由此試驗當中，認為10比5的包覆率效果顯而易見，故採用此比例進行後面的細胞試驗。

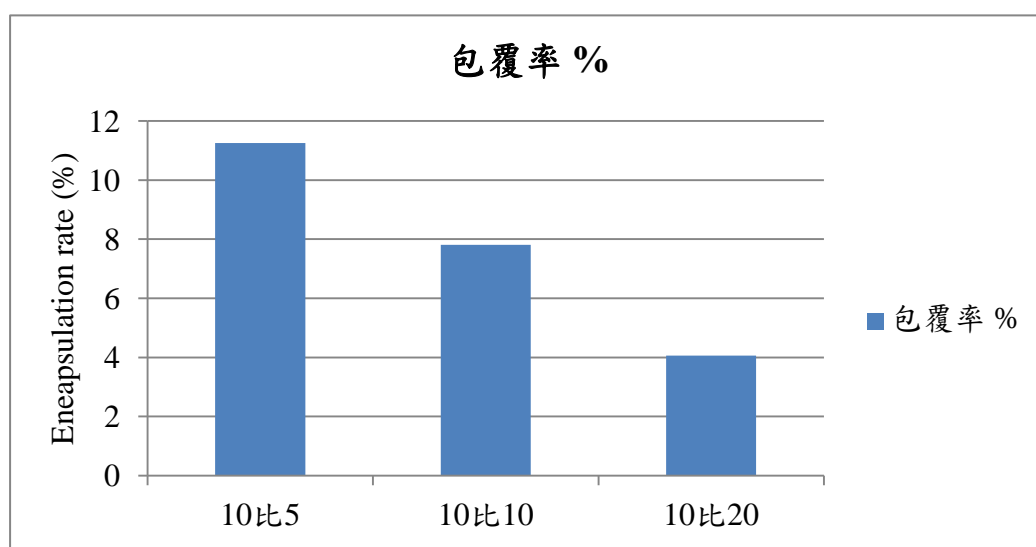


圖 21、微胞對 curcumin 包覆率研究結果圖

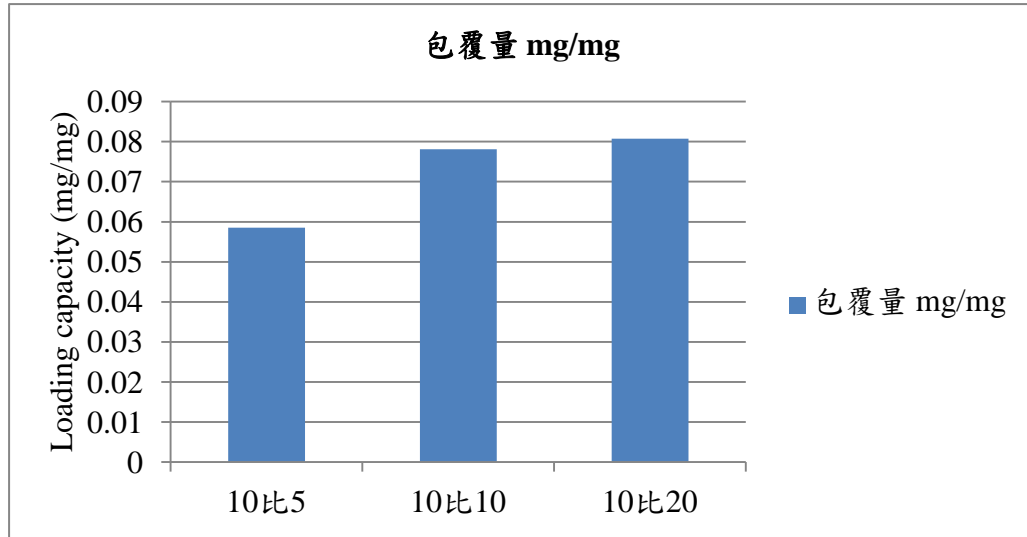


圖 22、微胞對 curcumin 包覆量研究結果圖

4-3 細胞毒性分析測試結果

採用 COS-7 細胞株來測定本實驗中所合成出的兩性共聚物包覆藥物與 Free 藥物之細胞毒性比較。

Free 藥物與細胞培養 24 小時及 48 小時為圖X，百分比顯示隨著濃度高低的變化，其細胞的毒殺效果和濃度成正比關係，濃度越高的薑黃素藥物毒殺效果較好。

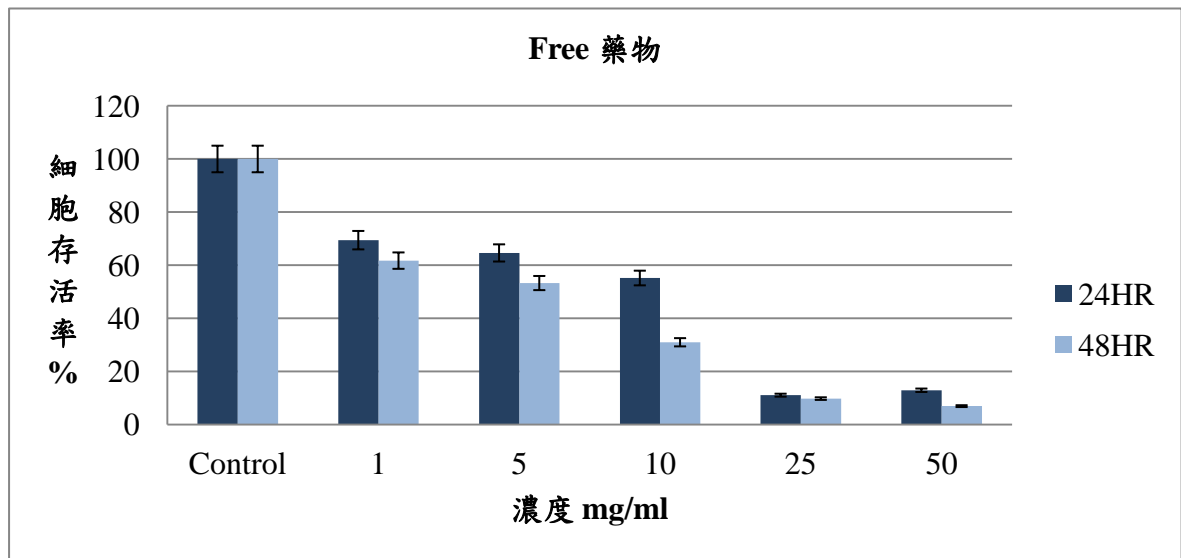


圖 23、Free 藥物對體外細胞培養 24 小時及 48 小時之毒殺效果研究結果圖

本實驗所合成的微胞包覆藥物的結果與細胞共培養 24 小時及 48 小時為圖X，百分比顯示隨著濃度高低的變化，其細胞的毒殺效果和微胞濃度成正比相關係，微胞的濃度越高顯而易見其毒殺效果也就越好。

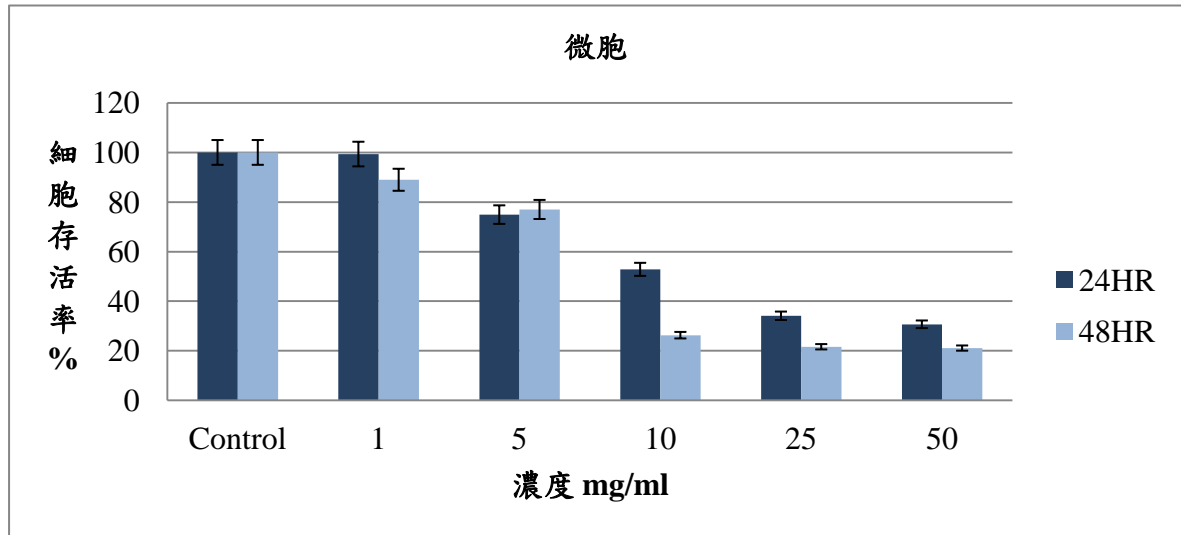


圖 24、微胞對體外細胞培養 24 小時及 48 小時之毒殺效果研究結果圖

第五章 結論

本研究所選用的生物可降解之聚酯類材料與疏水性的 PLGA 形成兩性共聚物，以樹枝狀聚胺基甲酸酯作為親水端，以 poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) PLGA 作為疏水端，合成出兩性高分子 PUAD-PLGA，經由 FT-IR、¹H-NMR 等結構鑑定，結構分析結果合成無誤。由非洲綠猴腎細胞 COS-7 細胞株，進行薑黃素與微胞的毒性測試，結果顯示隨著薑黃素的含量增加，因此細胞存活率跟著下降。兩性共聚物 PUAD-PLGA 成功了包覆薑黃素，增加了薑黃素在水中的溶解度，並提高了運用度。

而本研究還有許多能探討修改的方向，如調整親水端 PUAD 與疏水端 PLGA 分子量大小，探討不同分子量大小對於微胞所能包覆藥物能力的效果是否會受到影響，亦或是探討許多不同的包藥方法，除了溶劑蒸發法外，是否會有更好的包藥效果等，還有深入了解許多疏水性藥物載體之性質，並延伸兩性共聚物對於藥物傳輸系統的運用。

第六章 參考文獻

1. Yokoyama M. Clinical Applications of Polymeric Micelle Carrier Systems in Chemotherapy and Image Diagnosis of Solid Tumors. *J Exp Clin Med.* 2011;3:151-158.
2. Kwon GS, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Biodistribution of micelle-forming polymer-drug conjugates. *Pharmaceutical research.* 1993;10:970-974.
3. Bae Y, Fukushima S, Harada A, Kataoka K. Design of environment-sensitive supermolecular assemblies for intracellular drug delivery: polymeric micelles that are responsive to intercellular pH change. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003;42:4640-4643.
4. Yu BG, Okano T, Kataoka K, Sardari S, Kwon GS. In vitro dissociation of antifungal efficacy and toxicity for amphotericin B-loaded poly(ethylene oxide)-block-poly(beta benzyl L aspartate) micelle. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 1998;56:285-291.
5. Buhleier E, Wehner W, Vögtle F. Cascade and Non-spiral-chain-like Synthesis of molecular Cavity Topologies. *Synthesis.* 1978;155-158.
6. Tomalia DA, Baker H, Dewald JR, et al. A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules. *Polym. J.* 1985;17:117-132.
7. Newkome Moorefield CN, Baker VK, et al. Cascade molecules: A new Approach to micelles. *J.Org.Chem.* 1985;50:2003-2004.
8. Newkome GR, Yao Z, Baker VK, Cascade molecules: Synthesis and characterization of a benzene[9]³-arborol, *J. Am. Chem. Soc.* 1986;108:849-850.
9. Hawker CJ, Fréchet JMJ. Preparation of polymers with controlled molecular

- architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1990;112:7638-7647.
10. Wooley KL, Hawker CJ, Fréchet JMJ, Polymers With Controlled Molecular Architecture: Control of Surface Functionality In The Synthesis Of Dendritic Hyperbranched Macromolecules Using The Convergent Approach. *J. Chem. Soc. Perkin I.* 1991;1059-1076.
 11. Hawker CJ, Fréchet JMJ. Unusual Macromolecular Architecture: The Convergent Growth Approach to Dendritic Polysters and Novel Block CoPolymers. *J. Am. Chem. Soc.* 1992;114:8405-8413.
 12. Walter MV, Malkoch M. Accelerated Approaches to Dendrimers. *WileyVCH.* 2012;33:1027-1053.
 13. Mintzer MA, Grinstaff MW. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem Soc Rev.* 2011;40:173-190.
 14. Di Toro R, Betti V, Spampinato S. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(DL-lactide-co-glycolide) copolymers. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences.* 2004;21:161-169.
 15. Faisant N, Akiki J, Siepmann F, Benoit JP, Siepmann J. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: experiment and theory. *International journal of pharmaceutics.* 2006;314:189-197.
 16. Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2002;16:1217-1226.
 17. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable

- poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21:2475-2490.
18. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical pharmacology*. 2008;76:1590-1611.
 19. Ray B, Lahiri DK. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: different molecular targets and potential therapeutic agents including curcumin. *Current opinion in pharmacology*. 2009;9:434-444.
 20. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as Curcumin: from kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology*. 2008;75:787-809.
 21. Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer research*. 1995;55:259-266.
 22. Lasic DD. Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature*. 1996;380:561-562.
 23. Liang Peng, Bochu Wang, Peng Ren. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005;45:108-111.